

**BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT DER
 β -GLUCURONIDASE IM HARN
VON PATIENTEN MIT BLASENKREBS
UNTER BERÜCKSICHTIGUNG
IHRER RAUCHGEWOHNHEITEN**

Helmut Pabst

1976

AUS DEM INSTITUT FÜR KLINISCHE CHEMIE UND KLINISCHE BIOCHEMIE

DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

(Komm. Leiter: Professor Dr. H. Fritz)

und

AUS DEM INSTITUT FÜR KLINISCHE CHEMIE

DEUTSCHES HERZZENTRUM DES FREISTAATES BAYERN

(Direktor: Professor Dr. H. Schievelbein)

BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT DER β -GLUCURONIDASE

IM HARN VON PATIENTEN MIT BLASENKREBS

UNTER BERÜCKSICHTIGUNG IHRER RAUCHGEWOHNHEITEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Helmut Pabst

aus München

München 1976



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter : Professor Dr. H. Schievelbein
Mitberichterstatter : Professor Dr. H. Fritz
Dekan : Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 4.5.1976

1904 Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Vorbereitungen des Lesers
2. Übersicht über das Buch
- 3.1. Vorwort
- 3.2. Aufbau und Gliederung
- 3.3. Zusammenfassung des Inhalts
- 3.4. Zusammenfassung der Teile
4. Festlegung der Ziele
- 5.1. Zusammenfassung der Ziele
- 5.2. Zusammenfassung der Ziele
- 5.3. Zusammenfassung der Ziele
- 5.4. Zusammenfassung der Ziele
- 5.5. Zusammenfassung der Ziele
6. Zusammenfassung
- 7.1. Zusammenfassung der Ziele
- 7.2. Zusammenfassung der Ziele
- 7.3. Zusammenfassung der Ziele
8. Zusammenfassung
9. Zusammenfassung
10. Zusammenfassung

INHALTSÜBERSICHT

1. Einleitung und geschichtlicher Rückblick
2. Übersicht über die β -Glucuronidase
 - 2.1. Vorkommen
 - 2.2. Aufgabe und Wirkungsweise
 - 2.3. Aufgabestellung dieser Arbeit
 - 2.4. β -Glucuronidase im Urin
3. Bestimmungsmethode
 - 3.1. Bisherige Methoden
 - 3.2. Methode nach Szasz
 - 3.2.1. Bestimmung im Urin
 - 3.2.1.1. Vorbereitung des Urins
 - 3.2.2. Modifizierung des Bestimmungsansatz
 - 3.2.3. Endgültiger Ansatz
 - 3.2.4. Substrat-Wirkungskurve
 - 3.2.5. Aktivitätsmessung
4. Ergebnisse
 - 4.1. Tabellarische Übersicht
 - 4.2. Abhängigkeit vom Rauchen?
 - 4.3. Abhängigkeit von Tumoren?
5. Diskussion
6. Zusammenfassung
7. Literaturverzeichnis
8. Lebenslauf

1. Einleitung und geschichtlicher Rückblick

Bereits 1905 werden von NEUBERG und NEIMANN (1) im Zentralblatt für physiologische Chemie erste Untersuchungen über ein Experiment veröffentlicht, bei welchen Phenylglucuronsäure durch Pflanzensäfte (Euxanthinsäure) gespalten wird. HILDEBRAND (1905), HÄMÄLAINEN (1910) und ISHIDATE (1929) hydrolysieren mit pflanzlichen Extrakten Campher-, Menthol- und Vanillinglucuronsäure. 1915 gelangen SERA (2) diese Versuche mit sogenannten "Organsäften". 1934 veröffentlichen dann MASANUME und OSHINA im J. Biochemic. drei Arbeiten, die erste grundlegende Erkenntnisse über Vorkommen und Eigenschaften der organischen " β -Glucuronosidase" beinhalten (3).

1939 tauft FISHMAN in seiner Inaugurationsarbeit das Enzym um und gab ihm den heute gebräuchlichen Namen β -Glucuronidase. Gleichzeitig gelang ihm die Reinigung und Darstellung des Enzyms aus tierischem Gewebe.

2. Übersicht über die β -Glucuronidase

Das Enzym β -Glucuronidase spaltet in seiner Eigenschaft als Hydrolase glukuronisierte Verbindungen in Glucuronsäure und das dazugehörige Aglykon. FISHMAN, BOYLAND, LEWY, OSHINA, DOHRMANN und viele andere haben sich in der Folgezeit mit diesem Enzym, seiner Präparation, seiner quantitativen und qualitativen Bestimmung beschäftigt.

2.1. Vorkommen

Die β -Glucuronidase ist ein ubiquitäres Enzym. Die wichtigsten Quellen für die Darstellung des Enzyms sind: Kalbsleber, *Helix pomatia*, Urin, Leber und Nieren der Maus, Vorhautdrüse der weiblichen Ratte, *Patella vulgata* sowie *Escherichia coli*. In Tabelle 1 sind die Werte von LEWY und MARSH übernommen (4). Eine Verminderung der β -Glucuronidase wurde bei kastrierten weiblichen Mäusen festgestellt. Diese Tatsache wird in Zusammenhang mit dem Hormonstoffwechsel gebracht. Die Veränderungen der Serumaktivität während der Schwangerschaft, dem Menstruationszyklus und die Unterschiede zwischen dem zeugungsfähigen Alter und der Menopause sprechen ebenfalls dafür. Ein weiterer Hinweis dafür ist es, daß mit Östrogenen eine erniedrigte Enzymaktivität im Serum wieder normalisiert werden kann. Eine vermehrte Aktivität des Enzyms in der Wachstumsphase von Leber, Milz und Nieren junger Mäuse wurde von LEWY und Mitarbeiter (5) beschrieben. Der Autor führt dies auf die gesteigerte Zellproliferation zurück. Ebenfalls auf die vermehrte Zelltätigkeit führen diese Autoren den Anstieg der Serumaktivität nach Verfütterung von toxischen Substanzen wie Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Phosphor, Quecksilbernitrat, Phenylarsensäure und Uranylacetat zurück (5, 6). FISHMAN et al. deuten diese Befunde als verstärkte Entgiftungsfunktion im Rahmen der Glucuronidsynthese (7). Auf die eindeutige erhöhte Aktivität des Enzyms im Carcinomgewebe wird später näher eingegangen.

Tab. 1: Zusammenstellung der wichtigsten Quellen der β -Glucuronidase (nach LEWY und MARSH)

	Ex10 ³	Test
Maus		
Samendrüse	15	p
Milz	4,5	p
Ratte		
Nebenniere	5 - 10	p
Nebenhoden	10	p
Jejunum	5	p
Niere	4 - 6	p
Leber	20 - 30	p
Lunge	5	p
Lymphknoten	14	p
Eierstock	9	p
Vorhautdrüse (weibl. Tier)	2000	p
Prostata	2 - 6	p
Milz	15 - 30	p
Thymus	6	p
Schilddrüse	6	p
Uterus	7 - 9	p
Mensch		
Krebsgewebe	0,5 - 20	p
Niere	7	p
Leber	11	p
Milz	6,5	p
Rind		
Leber	6	p
Hund		
Caecum	8	p
Puter		
Niere, Leber, Milz	5	p
Forelle		
Niere, Leber	8	p
Mollusken		
Patella vulgata	100	p
Helix pomatia	150	p
Helix aspersa	13,5	C
Buccinum undatum	9	CP
Gibbula cineraria	5	CP
Mytilus edulis	14	CP
Ostrea edulis	10	CP
Calliostoma zizyphinum	8	CP
Nucella lapillus	9	CP
Osilinus lineatus	53	CP
Littorina littorea	20	CP
G. umbilicalis	44	CP
Insekten		
Locusta migratoria	112	M

2.2. Aufgabe und Wirkungsweise

Im Rahmen des Entgiftungsstoffwechsels des tierischen und menschlichen Organismus gibt es vier chemisch definierte Reaktionen: Oxydation, Reduktion, Hydrolyse und Synthese. Die chemische Struktur der zu entgiftenden Substanz ist ausschlaggebend, welche Reaktion eingegangen wird.

Während der hydrolytische Effekt der β -Glucuronidase seit langem bekannt ist, wurden in den letzten Jahren ein katalysierender Mechanismus bei der Bildung eines Aglykon-Glucuronats diskutiert (8).

Einen möglichen Regulationsmechanismus zeigt R.E. DOHRMANN (8) auf. Falls das Enzym sowohl einen hydrolisierenden als auch einen transferierenden Charakter hat, wäre die β -Glucuronidase selektiv antagonistisch gegen eine zu reichliche Glucuronidierung wirksam. Zum Beispiel würde eine Verschiebung des Sexualhormonspiegels regulierend auf die induktive Enzymsynthese wirken. Einer Steigerung des Hormonspiegels würde eine Zunahme, einer Minderung würde ein Abfall der β -Glucuronidase-Konzentration folgen. Das Prinzip dieses Regulationsmechanismus nach DOHRMANN ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

Hiermit würde dem Organismus eine Steuerungsmöglichkeit zur Verfügung stehen, mit dessen Hilfe eine den physiologischen Erfordernissen entsprechende Hormon- oder ähnliche Wirkstoffdosis in den verschiedenen Organen gewährleistet ist, während andererseits, infolge einer sofortigen Glucuronidierung, eine

optimale Wirkstoffkonzentration nicht erreicht werden könnte.

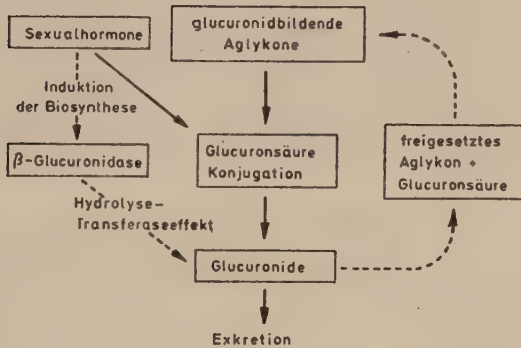


Abb. 1: Funktion der β -Glucuronidierung
→ gesicherte Stoffwechselabläufe
-----> hypothetische Steuerung der Glucuronidierung
(aus: DOHRMANN, R.E.
 β -Glucuronidase
Berlin: Springer 1969, S. 9)

2.3. Aufgabestellung dieser Arbeit

Die Aufgabe dieser Dissertationsarbeit ist es, im Rahmen einer Studie über die Auswirkung des Rauchens auf den Tryptophanstoffwechsel zu prüfen, wie sich die Aktivität der β -Glucuronidase im Urin von Nichtrauchern und Rauchern bei Normalpersonen, Patienten mit allgemeinen Erkrankungen und Blasenkarzinom-Patienten verhält.

BOYLAND (34) fand 1955, daß carcinogene Tryptophanmetaboliten wie 3-Hydroxyanthranilsäure, 3-Hydroxy-kynurenin und 2-Amino-

-3-hydroxy-acetophenonsäure im Harn von Patienten mit Blasen-Carcinomen vermehrt ausgeschieden werden. Darüberhinaus konnte er feststellen, daß die Aktivität der Esterasen, die die erwähnten Metaboliten aus ihren konjugierten Verbindungen freisetzen, im Harn der Patienten vermehrt ist und damit zur möglichen Carcinogenität dieser Verbindungen beiträgt (35, 36).

Im Zusammenhang mit der erwähnten Studie über die Auswirkungen des Rauchens auf den Tryptophanstoffwechsel im Hinblick auf die Ätiologie des Blasen-Carcinoms sollte festgestellt werden, ob ein Unterschied in der Ausscheidung der β -Glucuronidase zwischen Rauchern und Nichtrauchern bei Patienten mit einem Carcinom der Harnblase besteht.

Übereinstimmend berichten einige Autoren (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16), daß im neoplastischen Gewebe eine höhere β -Glucuronidase-Aktivität herrscht als im gesunden Gewebe. Diese Autoren führen daher den erhöhten β -Glucuronidase-Spiegel im Urin von Blasenkrebspatienten auf den höheren Gehalt im zerfallenden Gewebe zurück. Im Gegensatz dazu stehen andere Autoren (17, 18, 19), die die erhöhte β -Glucuronidase-Aktivität für das Blasencarcinom verantwortlich machen.

2.4. β -Glucuronidase im Urin

Die Aufgabe der β -Glucuronidase im Urin ist bisher noch nicht geklärt. Auch über den eigentlichen Ursprungsort ist man sich

nicht einig. FISHMAN et al. halten es für wahrscheinlich, daß die β -Glucuronidase im Urin aus der Niere stammt (20). Die Ausscheidung an β -Glucuronidase unterliegt sehr großen Tagesschwankungen und steht in keiner Beziehung zur Kreatininclearance (21). Es ist anzunehmen, daß der weitaus größte Teil durch aktive Enzymsekretion aus dem Bereich der Tubuli kommt (22).

Eine eindeutige Enzymvermehrung findet sich beim Blasencarcinom (17, 18, 24, 25, 26). Während einige Autoren die erhöhte Aktivität durch eine vermehrte Abgabe des Enzyms aus zerfallendem Carcinomgewebe erklären, haben MATTEA, BOYLAND und Mitarbeiter eine Hypothese aufgrund ihrer Untersuchungen bei Chemiearbeitern, die in ständigem Kontakt mit aromatischen Substanzen waren, aufgestellt (19, 29). Sie zeigen den hypothetischen Mechanismus der carcinogenen Wirkung am Beispiel von 2-Naphthylamin. Danach wird 2-Naphthylamin nach Resorption durch Oxydation zum carcinogenen 2-Amino-1-naphthol. Dies wird in der Leber sofort glucuroniert. Da die Koppelung an die Glucuronsäure zehnmal schneller erfolgt als die Oxydation, und das Glucuronid keine carcinogene Wirkung hat, ist eine neoplastische Umwandlung der Leber oder anderer Organe nicht sehr wahrscheinlich. Nach Ausscheidung des 2-Amino-1-naphthol könnte bei entsprechender β -Glucuronidase-Konzentration im Harn und bei Hydrolyseoptimum das Aglykon abgespalten werden und seine carcinogene Wirkung in der Blase entfalten. Diese Hypothese wird auch gestützt durch die Tatsache, daß bei diesen

Chemiearbeitern in einem relativ hohen Prozentsatz ein Carcinom der Blase auftritt, und daß MATTEA bei dieser Personengruppe selbst dann eine erhöhte β -Glucuronidase-Aktivität im Urin feststellte, wenn keine neoplastischen Umwandlungen vorlagen (19).

Nicht damit übereinstimmt die Feststellung von SORRENTINO und ROMANO, die eine Spaltung von Phenolphthalein-Glucuronid im frischen Urin selbst bei Hydrolyseoptimum nicht erreichten (27).

3. Bestimmungsmethode

3.1. Bisherige Methoden

Die gebräuchlichste Methode zur Bestimmung der Aktivität der β -Glucuronidase wurde von FISHMAN (28) entwickelt. Hierbei wird ein leicht nachweisbares Aglykon, welches entsprechend der Intensität der enzymatischen Hydrolyse in unterschiedlicher Menge aus dem Glucuronidkomplex abgespalten wird, colorimetrisch quantitativ gemessen. FISHMAN verwendet als Substrat das Phenolphthalein-Glucuronid. Bei verschiedenen Modifizierungen dieser Methode wird als Substrat Phenyl-, p-Nitrophenyl- (31), 8-Quinolinylnyl- (29) oder Harmol-(30)-Glucuronid verwendet.

Die von FISHMAN angegebene Arbeitsvorschrift lautet folgendermaßen:

Ansatz der Analyse:

0,8 ml Acetatpuffer (pH 4,5 - 5,0)

0,1 ml Enzymlösung

0,1 ml Phenolphthalein-Glucuronid-Lösung (0,01 m)

Hydrolysedauer bei 37° C (Wasserbad) für die Aktivitätsmessung im Serum 15 - 24 Stunden. Für enzymreiche Suspensionen 1 - 5 Stunden.

Zur Proteinfällung gibt man:

1,5 ml Trichloressigsäure 5 %ig

1,5 ml Aqua bidest

Zur Beendigung der Reaktion und zur Herstellung des Farbkomplexes

2,0 ml Glycinpuffer nach Sörensen (pH 10,4)

0,5 ml NaOH (0,5 n)

Die entstandene rote Farbe wird mit dem Filter von 552 nm photometrisch gemessen.

Bei enzymreichen Suspensionen ist diese Methode ohne weiteres anzuwenden. Ein Nachteil dieser Bestimmung ist jedoch die starke Abhängigkeit der Farbintensität und der Farbstabilität vom pH-Wert. Die maximale Farbintensität wird erst bei einem pH-Wert von 11,0 erreicht. In diesem Bereich ist die Farbe aber nicht mehr stabil (32). Ein weiterer Nachteil ist die nicht streng linear verlaufende Aktivitätskurve.

Normalerweise verläuft die Hydrolyse in den ersten 10 Stunden linear. Bei verminderter Substratspaltung entsteht allerdings ein gebogener Kurvenverlauf, so daß die gemessene Extinktion nicht mehr der tatsächlichen Aktivität entspricht. Daher sol-

len bei dieser Methode Aktivitätskurven erstellt werden, die die initiale Spaltungsgeschwindigkeit ermitteln.

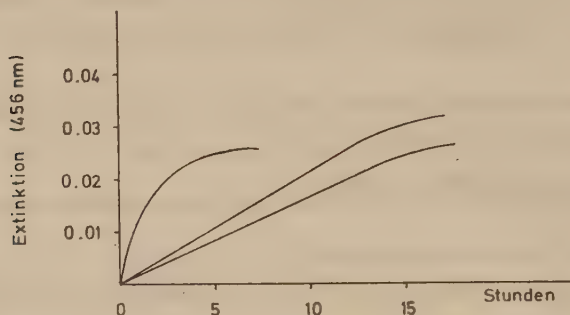


Abb. 2: Unterschiedliche Spaltungsverläufe von Phenolphthalein-Glucuronid durch verschiedene Humansera.

Verschiedene Modifikationen wurden erstellt, die sich für eine Routineuntersuchung ebenfalls als anfällig erwiesen.

Eine verbesserte Methode hat DOHRMANN erstellt (9).

Ansatz nach DOHRMANN:

0,6 ml Acetatpuffer (pH 5,0)

0,2 ml Enzymlösung

0,2 ml Phenolphthalein-Glucuronid-Lösung (0,01 m)

Reaktionstemperatur: 37° C (Wasserbad) für 4 - 6 Stunden, bei hohem Enzymgehalt 10 - 30 Minuten.

Zum Abstoppen der Reaktion und zur Bildung des Farbkomplexes 2,0 ml Glycinpuffer nach Sörensen (pH 10,4)

0,5 ml NaOH (0,1 n)

Gemessen wird bei Filter 456 nm.

Die ermittelte Extinktion, abzüglich der Leerwerte, wird in ein Koordinatensystem eingetragen. Mit Hilfe einer Eichkurve kann die pro Zeiteinheit freigesetzte Menge Phenolphthalein errechnet werden.

3.2. Methode nach SZASZ

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmungsmethode nach SZASZ verwendet. Hierbei wird als Substrat p-Nitrophenyl- β -Glucuronid verwendet. Die Methode ist im Prinzip ein ähnliches Verfahren wie die Phosphatase-Bestimmung nach BESSEY et al.

Das Absorptionsmaximum von p-Nitrophenol liegt bei 400 nm. In diesem Bereich absorbiert das dazugehörige Glucuronid-Derivat praktisch überhaupt nicht (32). Die Farbintensität und Farbstabilität ist in einem relativ breiten Bereich (pH 9,0 - 13,0) praktisch gleich.

Auch die Inkubationszeit und die gemessene Aktivität stehen in einer streng linearen Beziehung während der ersten 10 Stunden (nach SZASZ). Eine direkte Proportionalität bis 20 Stunden hat KATO beschrieben (33).

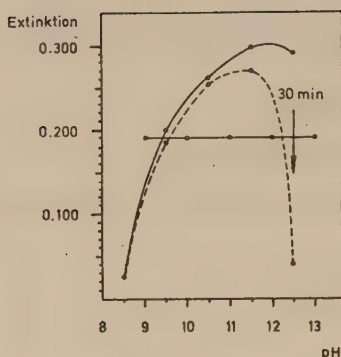


Abb. 3: Die Intensität und Stabilität der Farbe vom Phenolphthalein und von p-Nitrophenol in Funktion des pH.
o--o Phenolphthalein, 10 µM in Glycinpuffer; die Extinktion sofort abgelesen
o--o dasselbe nach 30 Minuten
o—o p-Nitrophenol, 10 µM in Glycinpuffer (32).

Der Ansatz zur Aktivitätsmessung wird von SZASZ folgendermaßen angegeben:

Reagenzien:

Essigsäure-Acetat-Puffer nach WALEPOLE 0,2 M, pH 4,0

p-Nitrophenyl-Glucuronid-Lösung 50 mM, 78,75 mg

werden in 5,0 ml Aqua bidest gelöst.

p-Nitrophenol-Standard: eine Stammlösung von 3 mM,

41,76 mg p-Nitrophenol werden in 100 ml NaOH (0,02 n) gelöst; wird vor Gebrauch auf 1 : 10 verdünnt.

NaOH 0,15 n

Analysenansatz

Ansätze in ml	A	AL	RL	St	WL
Serum	0,1	0,1	-	-	-
Standard	-	-	-	0,1	-
Puffer	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Aqua bidest.	-	0,1	0,1	0,1	0,2
Substrat	0,1	-	0,1	-	-
5 Stunden bei 25° C inkubieren (oder 20 Min. bei 50° C)					
NaOH 0,15 n	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Nach 30 Minuten in 10 mm Küvetten bei 405 nm alle Ansätze gegen Wasserleerwert (WL) ablesen.

A Analyse

AL Analysen-Leerwert

RL Reagenzien-Leerwert

St Standard

WL Wasser-Leerwert

3.2.1. Bestimmung im Urin

Da SZASZ diese Methode zur Aktivitätsbestimmung der β -Glucuronidase im Humanserum recht erfolgreich angewandt hat, war zu erwarten, daß sie auch bei einer Aktivitätsmessung im Urin praktikabel ist. Es wurden Überlegungen angestellt, in welcher Weise der Analysensatz geändert werden müßte, um auch im Urin ei-

ne exakte Aktivitätsmessung durchführen zu können.

Dazu wurde der 24-Stunden-Urin von gesunden Personen (n=29), von Krankenhauspatienten ohne Neoplasien (n=33) und von Patienten mit Blasenkarzinomen (n=27) gesammelt und eingefroren. Es wurde innerhalb der Gruppen noch die Unterteilung von Nicht-raucher zu Raucher getroffen.

3.2.1.1. Vorbereitung des Urins

Die Urinproben wurden im Rahmen eines größeren Forschungsprogramms gesammelt und eingefroren. Eine Schwierigkeit war die meist geringere Enzymkonzentration im Urin. Es wurde nur die noch vorhandene Enzymmenge gemessen und die einzelnen Patientengruppen miteinander verglichen.

Um die Enzymmenge zu konzentrieren, wurde der aufgetaute Urin mit Hilfe der Dialyse eingeeengt. In einem Dialysesystem (Sartorius) wurden 15,0 ml Urin auf weniger als 2,0 ml eingeeengt. Damit war eine Konzentration des Urins innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne (im Mittel 60 Minuten) möglich. Es wurden hierbei Selectron-Ultrahülsen verwendet. Der so eingeeengte Urin wurde vor dem Einpipettieren in den Analysenansatz mit dem vorher beschriebenen Essigsäure-Acetat-Puffer auf 2,0 ml aufgefüllt.

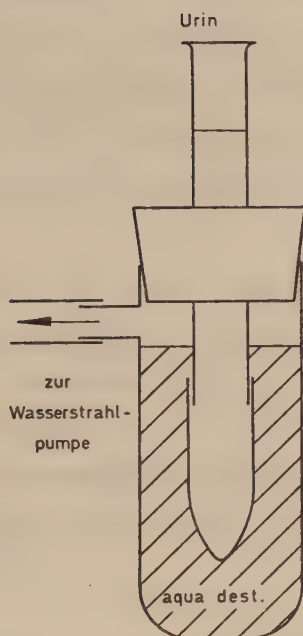


Abb. 4: Schema einer einzelnen Dialyseeinheit

3.2.2. Modifizierung des Bestimmungsansatzes

Von diesem eingeeengten Urin wurden 0,5 ml in den Analysenansatz gegeben, um auf diese Weise eine weitere Konzentration des Enzyms zu erreichen. Bei einigen Vorversuchen zeigte es sich, daß wir den von SZASZ angegebenen pH-Bereich von 9,0 bis 13,0 zur Aktivitätsmessung oft nur knapp erreichten. Deshalb gaben wir statt 1,0 ml NaOH 1,5 ml zum Abstoppen der Reaktion. Damit erreichten wir einen pH-Bereich von 11,5 - 12,0.

3.2.3. Endgültiger Ansatz

Der erarbeitete Bestimmungsansatz sah folgendermaßen aus:

Ansätze in ml	A	AL	RL	St	WL
Urin	0,5	0,5	-	-	-
Standard	-	-	-	0,1	-
Puffer	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Aqua bidest.	-	0,1	0,5	0,5	0,6
Substrat	0,1	-	0,1	-	-
1 Stunde inkubieren bei 37° C					
NaOH 0,15 n	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Nach 30 Minuten bei 405 nm ablesen.

Durch das erhöhte Analysenvolumen auf 0,5 ml und das Endvolumen auf 2,9 ml war eine erneute Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten nötig.

$$\begin{aligned}
 K &= \frac{10^6}{E_{\text{xd}}} \times \frac{E_{\text{v}}}{A_{\text{v}}} \times \frac{1}{t} \\
 &= \frac{10^6 \times 2,9 \times 1}{18530 \times 1 \times 0,5 \times 6} \\
 &= 5,21
 \end{aligned}$$

Mit Hilfe dieses molaren Extinktionskoeffizienten wurde die Aktivität in Millieinheiten (μU) nach der Formel

$$\mu\text{U} = E_{\text{A}} - (E_{\text{A}_1} + E_{\text{R}_1}) \times K \quad \text{berechnet, wobei}$$

ϵ der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol ist,
 d die Küvetten-Schichtdicke in cm, hier 1 cm,
 AV das Analysenvolumen in ml der eingesetzten Enzymlösung,
 EV das Endvolumen in ml.

3.2.4. Substrat-Wirkungs-Kurve

Aufgrund des auf 1,4 ml erhöhten Ansatz-Volumens war auch die molare Konzentration des Substrates verändert worden. Es war daher nötig, die Molarität der eingesetzten Substratlösung neu zu ermitteln.

Es wurde eine Stammlösung von p-Nitrophenyl-Glucuronid von 250 mM hergestellt und auf jeweils 50 mM, 75 mM, 100 mM und 125 mM verdünnt.

Da keine reine β -Glucuronidase zur Verfügung stand, wurden einige Urine mit verschiedenen Substratlösungen untersucht.

Bei allen Versuchen lag die größte Aktivität bei einer Substratlösung von 100 mM. Dies entspricht im Ansatzvolumen von 1,4 ml einer Konzentration von 7,14 mM. Dies liegt über der von SZASZ empfohlenen Konzentration von 5,0 mM, aber noch innerhalb der von KATO beobachteten Steigerung der Spaltung bis zu einer Konzentration von bis zu 10,0 mM.

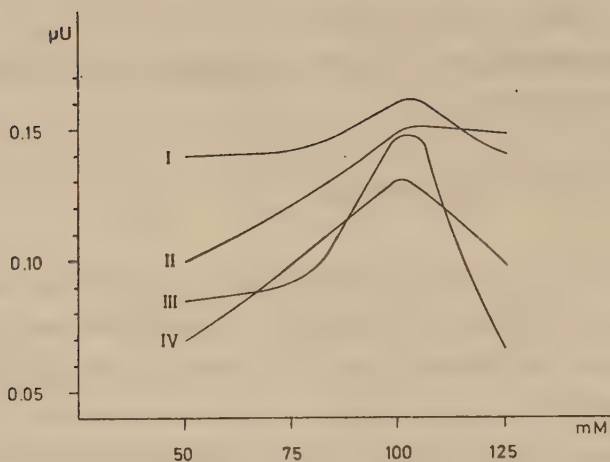


Abb. 5: Substrat-Wirkungskurven des p-Nitrophenyl-Glucuronid bei verschiedenen Konzentrationen und verschiedenen Urinen (I - IV).

3.2.5. Aktivitätsmessung

Die Aktivitätsmessung erfolgte an einem Photometer PM Q II (Zeiss) bei einer Spaltbreite von 0,02.

Die Extinktion der Reagenzienleerwerte lag zwischen 0,062 und 0,084.

Die Analysenleerwerte lagen zwischen 0,094 und 0,980.

Diese große Diskrepanz liegt wahrscheinlich in der unterschiedlich starken Beimengung von Ausscheidungsprodukten. Medikamente, die während der Therapie eingenommen wurden, dürften mit einer entscheidenden Rolle spielen, da die meisten dieser hohen Ana-

lysen-Leerwert-Extinktionen bei Krankenhauspatienten auftraten. Der bei Normalpersonen aufgetretene Extinktionswert lag meist zwischen 0,150 und 0,250.

4. Ergebnisse

4.1. Tabellarische Übersicht

Die ermittelten Meßdaten wurden in die folgenden Tabellen übertragen. Die einzelnen Gruppen wurden untereinander im Student-t-Test auf ihre Signifikanz verglichen, wobei speziell auf die Rauchgewohnheiten eingegangen wird. Eine Schwierigkeit liegt darin, daß die einzelnen Gruppen sich in der Anzahl der Personen doch oft erheblich unterscheiden.

Tabelle 3: Kontrollpersonen

VP	Nichtraucher $\mu\text{U} / \text{ml}$	VP	Raucher $\mu\text{U} / \text{ml}$
1	0,454	1	0,578
2	1,100	2	0,073
3	0,150	3	0,126
4	0,123	4	0,718
5	0,218	5	0,152
6	0,854	6	0,455
7	0,366	7	0,130
8	1,152	8	0,286
9	0,110	9	2,280
		10	0,073
		11	0,705
		12	0,828
		13	0,526
		14	1,710
		15	0,840
		16	0,177
		17	0,057
		18	0,088
		19	0,670

Tabelle 4: Patienten mit allgemeinen Erkrankungen

VP	Nichtraucher $\mu\text{U} / \text{ml}$	VP	Raucher $\mu\text{U} / \text{ml}$
1	1,681	1	0,187
2	0,536	2	0,240
3	0,152	3	0,146
4	1,632	4	0,052
5	0,130	5	0,097
6	0,073	6	0,083
7	0,104	7	1,082
8	2,578	8	0,068
9	0,119	9	0,078
10	0,097	10	0,156
11	0,770	11	0,078
12	0,120	12	0,458
13	0,170	13	2,084
14	0,402	14	0,302
15	0,258	15	0,142
16	0,260		
17	0,068		
18	0,412		

Tabelle 5: Blasencarcinom-Patienten

VP	Nichtraucher $\mu\text{U} / \text{ml}$	VP	Raucher $\mu\text{U} / \text{ml}$
1	0,115	1	0,104
2	0,183	2	0,745
3	7,950	3	0,063
4	1,460	4	0,715
		5	0,208
		6	0,224
		7	0,248
		8	0,385
		9	0,089
		10	0,266
		11	3,980
		12	0,104
		13	0,240
		14	0,136
		15	0,918
		16	0,418
		17	2,230
		18	3,875
		19	1,138
		20	9,900
		21	0,196
		22	2,260
		23	0,063

Tabelle 6: Mittelwert und Standardabweichung

Gruppe		μ U/ml	Anzahl	s
Kontrolle	Nichtraucher	0,503	9	0,427
	Raucher	0,551	19	0,587
Patienten allg.	Nichtraucher	0,531	18	0,708
	Raucher	0,350	15	0,545
Ca-Patienten	Nichtraucher	2,427	4	3,733
	Raucher	1,239	23	2,210

4.2. Abhängigkeit vom Rauchen?

Um die Fragestellung, ob ein Unterschied in der Aktivität der β -Glucuronidase bei Nichtrauchern und Rauchern besteht, wurden die Mittelwerte im Student-t-Test auf Signifikanz überprüft.

Kontrollpersonen

Nichtraucher (n = 9)
Raucher (n = 19)

$$0,40 > p < 0,45$$

Damit ist der Unterschied nicht signifikant.

Patienten allgemein

Nichtraucher (n = 18)
Raucher (n = 15)

$$0,35 > p < 0,40$$

Damit ist der Unterschied nicht signifikant.

Blasencarcinom-Patienten

Nichtraucher (n = 4)	
Raucher (n = 23)	$0,35 > p < 0,40$

Damit ist der Unterschied nicht signifikant.

Beim Vergleich der Mittelwerte innerhalb der eingeteilten Gruppen wurde die geforderte Signifikanzgrenze von $p = 0,025$ bzw. $2 p = 0,05$ nicht erreicht.

Beim Vergleich Nichtraucher gegen die Raucher aus den Gruppen "Kontrollpersonen" und "allgemeine Patienten" wurde diese Signifikanzgrenze ebenfalls nicht erreicht, aber doch schon merklich angenähert.

Nichtraucher (n = 27)	
Raucher (n = 35)	$0,10 > p < 0,05$

4.3. Abhängigkeit von Tumoren?

Der nach den vorliegenden Meßergebnissen signifikante Unterschied fand sich beim Vergleich der Mittelwerte aus den Gruppen "Kontrollpersonen" plus "allgemeine Patienten" gegen den Mittelwert aller Blasencarcinom-Patienten.

Nicht-Carcinom-Personen (n = 62)	
Blasencarcinom-Patienten (n = 27)	$p < 0,0005$

Dieses Ergebnis ist auch bei anderen Autoren beschrieben (25, 26, 27).

5. Diskussion

Die Schwierigkeiten einer Aktivitätsbestimmung der β -Glucuronidase im Urin beginnen bei der Sammlung des 24-Stunden-Urins. Man darf den Urin nicht ansäuern, da sonst ein pH-Optimum zur Spaltung erreicht werden könnte. Einen Verlust an Aktivität muß beim Einfrieren in Kauf genommen werden. Daher wurde hier nur der relative gemessene Wert in $\mu\text{U/ml}$ in die Auswertung einbezogen.

Bei einer Versuchsserie mit frischem Urin war eine Aktivitätsbestimmung ohne vorherige Dialyse möglich. Bei aufgetauten Urinen war dies in einigen Fällen nicht der Fall. Der Aktivitätsverlust beträgt nach SZASZ nach 6 Wochen etwa 7 % (31). Der von uns ermittelte Wert lag mit durchschnittlich 4 % noch etwas niedriger. Da der gesammelte Urin zum Teil älter als 6 Wochen war, wurde mit der oben beschriebenen Methode eine Eingengung vorgenommen, um einerseits eine Anreicherung an β -Glucuronidase zu bekommen und andererseits einen eventuellen Störfaktor durch Ausscheidungsprodukte zu eliminieren.

Durch die beschriebene Veränderung des Analysenansatzes konnte in allen Fällen in einem meßbaren Bereich gearbeitet werden. Urine, die kein meßbares Ergebnis brachten, wurden nicht mit in die Aufstellung mit eingenommen. Das war in 8 Versuchen der Fall. Dabei stand die Überlegung im Vordergrund, daß in jedem Urin eine gewisse Menge an β -Glucuronidase vorhanden sein muß. Bei den Versuchen mit frischem Urin konnte auch im-

mer eine Aktivität der β -Glucuronidase festgestellt werden. Wenn also in einem eingefrorenen und wieder aufgetauten Urin keine Aktivität mehr mit unserer Methode nachweisbar war, so mußte die Aktivität entweder während der Lagerzeit oder aber bereits vor dem Einfrieren verloren gegangen sein.

Der Signifikanztest nach Student ergab nur im Vergleich von Nicht-Carcinom-Patienten zu Blasenkarzinom-Patienten einen statistisch gesicherten Unterschied.

Diese Aussage steht im Einklang mit mehreren anderen Autoren. Nicht beantwortet werden kann die Frage, wodurch diese Erhöhung bei Blasenkarzinom-Patienten hervorgerufen wird.

Der Vergleich Nichtraucher zu Raucher ergab nur eine Annäherung an die geforderte Signifikanzgrenze. Die Frage, ob ein Raucher eine höhere Konzentration an β -Glucuronidase im Urin hat als der Nichtraucher und damit auch ein höheres Risiko eines Blasenkrebses, muß nach den vorliegenden Ergebnissen offen bleiben. Eine weitere Untersuchungsreihe mit einer spezielleren Fragestellung dürfte eine weitere Abklärung bringen.

6. Zusammenfassung

Es wird über eine Methode der β -Glucuronidase-Bestimmung im Urin von Blasenkrebs-Patienten unter Berücksichtigung der Rauchgewohnheiten berichtet. Als Substrat wurde p-Nitrophenyl-Glucuronid verwendet.

Es wurden insgesamt bei 87 Personen der 24-Stunden-Urin ge-

sammelt und eingefroren.

Die Einteilung dieser 87 Urinproben wurde in eine Kontrollgruppe, eine Gruppe von Krankenhauspatienten mit allgemeinen Erkrankungen und eine Gruppe von Blasenkrebs-Patienten vorgenommen. Eine weitere Unterteilung erfolgte durch eine Gruppierung in Raucher und Nichtraucher.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist eine signifikante Erhöhung der β -Glucuronidase nur bei Blasenkrebs-Patienten vorhanden. Der Vergleich Raucher zu Nichtraucher erbrachte nur eine Annäherung an die Signifikanzgrenze.

7. Literaturverzeichnis

1. NEUBERG, C.;
C. NEIMANN Synthese gepaarter Glucuronsäuren.
VIII. Mitteilung über Glucuronsäure.
Z.phys.Chem. 44, 114 (1905)
2. SERA, Y. Zur Kenntnis der gepaarten Glucuron-
säure.
III. Mitteilung. Über die Spaltung
der Orcin- und Phloroglucinglucuron-
säure durch Organsäfte.
Z.phys.Chem. 92, 261 (1915)
3. MASAMUNE, H. Biochemical studies on carbohydrates.
IV. On an enzyme which catalysis the
hydrolysis of biosynthetic osides of
glucuronic acid.
J.Biochem. (Tokyo) 19, 353 (1934)
4. LEWY, G.A.;
C.A. MARSH The preparation and properties of β -
glucuronidase.
V. Specifity.
Biochem.J. 52, 690 (1952)
5. LEWY, G.A.;
L.M.H. KERR;
J.G. CAMPBELL β -Glucuronidase and cell proliferation.
Biochem.J. 42, 462 (1948)
6. KERR, L.M.H.;
G.A. LEWY β -Glucuronidase and tissue damage.
Nature (London) 160, 463 (1947)
7. FISHMAN, W.H. Studies on β -Glucuronidase.
III. The increase in β -Glucuronidase
activity of mammalian tissues induced
by feeding glucuronidogenic substan-
ces.
J.biol.Chem 136, 229 (1940)
8. JOSHIDA, K.;
K. KATO;
H. TSUKAMOTO Glucuronyl transfer reaction catalysed
by β -Glucuronidase by the use of ester
glucuronides as substrates.
Chem.pharm.Bull. 12, 656 (1964)
9. DOHRMANN, R.E. Glucuronidierung, Teilfunktion des Ent-
giftungsstoffwechsels.
Med.Klin. 62, 537 (1967)

10. FISHMAN, W.H. β -Glucuronidase activity of the blood and tissues of obstetrical and surgical patients.
Science 105, 646 (1947)
11. FISHMAN, W.H.;
 A.J. ANLYAN The presence of high β -Glucuronidase activity in cancer tissue.
J.bio.Chem. 169, 449 (1947)
12. FISHMAN, W.H.;
 A.J. ANLYAN Comparison of β -Glucuronidase activity of normal, tumor lymphnode tissues of surgical patients.
Science 106, 66 (1947)
13. FISHMAN, W.H.;
 A.J. ANLYAN;
 E. GORDON β -Glucuronidase activity in human tissues. Some correlations with processes of malignant growth and with the physiology of reproduction.
Cancer Res. 7, 808 (1947)
14. FISHMAN, W.H.;
 R. BIGELOW Comparison study of morphology and glucuronidase activity in 44 gastrointestinal neoplasms.
J.nat.Cancer Inst. 10, 1115 (1950)
15. GROSS, S.J.;
 G. KINZIL Cytochemistry of benigne and malignant squamous epithelium of the cervix uteri.
 II. Ribonucleic acid, desoxyribonucleic acid, β -Glucuronidase and phosphamidase.
Obstetr.Gynec. 19, 28 (1962)
16. KASDON, S.C.;
 W.H. FISHMAN;
 F. HOMBURGER β -Glucuronidase studies in women.
 II. Cancer of cervix uteri.
J.Amer.med.Ass. 144, 842 (1950)
17. MATTEA, E.;
 E. PETRA;
 E. VESCIA Stability of urinary β -Glucuronidase during urine collection and its curve of daily excretion in malignant tumors of bladder.
Tumori 45, 229 (1959)
18. MATTEA, E.;
 E. PIETRA Determination of urinary β -Glucuronidase. Its behaviour in vesical malignant tumors.
Tumori 45, 86 (1959)

19. MATTEA, E.;
E. PETRA
Increase of the β -Glucuronidase activity of urine in benzidine workers. Correlation between enzymic activity and vesical cancerogenesis.
Tumori 45, 239 (1959)
20. FISHMAN, W.H.;
M. ARTENSTEIN;
S. GREEN
The renal β -Glucuronidase response to androgens.
Endocrinology 57, 646 (1955)
21. KERR, W.K.;
M. BARKIN;
J. D'ALOISIO;
Z. MENCZYK
Biochemical factors in the etiology of carcinoma of the bladder. The role of β -Glucuronidase.
Cancer (Philad.) 16, 633 (1963)
22. PANOTTI, M.
The histochemical localization of β -Glucuronidase in the kidney of *Cavia Cobaia* during fetal and postnatal life.
Boll.Soc.ital.Biol.sper. 28, 1337 (1952)
23. BOYLAND, E.
The biochemistry of cancer of the bladder.
Brit.med.Bull. 14, 153 (1958)
24. COSTA, V.
 β -Glucuronidase in vesical neoplasie.
Neoplasie 10, 391 (1957)
25. HAIJE, W.G.;
B.H.P. VAN DER WERF-
MESSING
The origin of the β -Glucuronidase activity in the urine of patients with cancer of the bladder.
Brit.J.Cancer 16, 570 (1962)
26. SORRENTINO, F.;
C. ROMANO
Actual urinary β -Glucuronidase activity and cancer of the bladder.
Urol.int. (Basel) 11, 232 (1961)
27. SORRENTINO, F.;
C. ROMANO
Tolerance test with phenolphthalein. Its detoxication. Urinary β -Glucuronidase activity in vivo of patients with bladder neoplasm.
Urol.int. (Basel) 12, 328 (1961)

28. FISHMAN, W.H. β -Glucuronidase.
in: SUMNER, J.B.; K. MYRBÄCK
The Enzymes. I., Part. 1
New York: Academic Press, p. 635

29. FRIEDENWALD, J.S.; Histochemical localization of glucuron-
B. BECKER idase.
J.cell.comp.Physiol. 31, 303 (1948)

30. KIM PING WONG A new fluorimetric assay of β -Glucuron-
 idase in tissue and serum.
Anal.Biochem. 35, 35 (1970)

31. SZASZ, G.; Enzymaktivitätsbestimmung im Kindes-
 ZS. CZIRBESZ; alter.
 P. CSAKI IV. β -Glucuronidase im Serum und Harn
 beim nephrotischen Syndrom.
Act.paediat.Hung. 5, 349 (1964)

32. SZASZ, G. Die Bestimmung der β -Glucuronidase Ak-
 tivität im Serum mit p-Nitrophenyl-
 Glucuronid.
Clin.Chem.Acta 15, 275 (1967)

33. KATO, K.; Synthesis of p-nitrophenyl- β -D-glucop-
 K. YOSHIDA; yranosiduronic acid and its utiliza-
 H. TSUKAMATO; tion as a substrate for assay of β -
 M. NOBUNAGA; -Glucuronidase activity.
 T. MASUYA; Chem.Pharm.Bull.(Tokyo) 8, 239 (1960)
 T. SAWADA

34. BOYLAND, E. Tumours of the Bladder.
 Wallace, D.
 Edinburgh, London: Livingstone 1970,
 p. 83

35. BOYLAND, E.; Brit.J.Cancer 9, 62 (1955)
 D. WALLACE;
 D.C. WILLIAMS

36. BOYLAND, E.; Brit.J.Cancer 11, 42 (1957)
 J.E. GASSON;
 D.C. WILLIAMS

Danksagung

Herrn Professor Dr. H. Schievelbein danke ich für die Überlassung des Themas.

Frau Inge Kunze und Frau Karin Loeschenkohl danke ich für die Einführung in die praktischen Arbeiten.

Lebenslauf

Am 12.7.1942 wurde ich in München als sechstes Kind von Dr. med. Heinrich Pabst und Ilse Pabst, geb. Krick, geboren.

In Gilching, Kreis Starnberg, aufgewachsen, ging ich dort auch die ersten beiden Jahre in die Volksschule. 1950 übersiedelten wir nach München.

1951 verunglückte mein Vater tödlich. Im September 1953 kam ich auf das Wittelsbacher Gymnasium in München. Dort absolvierte ich im Juni 1963 mein Abitur. Vom Oktober 1963 bis September 1964 leistete ich meine Wehrpflicht ab und schied als Fahnenjunker d.R. aus.

Im Wintersemester 1964 begann ich in München mit meinem Medizinstudium. Dort bestand ich im Sommersemester 1965 mein Vorphysikum mit der Note "sehr gut", im Wintersemester 1966/67 mein Physikum mit der Note "gut" und im Dezember 1970 mein Staatsexamen mit der Note "gut".

Helmut Pabst

